

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-104927

⑬ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)5月10日

A 61 K 31/70  
// A 61 K 35/78  
C 07 H 13/08

A E D

8413-4C

7138-4C

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 アルドースリグクターゼ阻害剤

⑯ 特 願 昭61-248391

⑰ 出 願 昭61(1986)10月21日

⑱ 発 明 者 女 屋 敏 正 山梨県中巨摩郡玉穂町成島1559-1 医大成島宿舍A-404

⑲ 発 明 者 多 和 田 真 人 山梨県中巨摩郡玉穂町下河東472 医大上久保宿舍C-403

⑳ 発 明 者 佐 々 木 博 茨城県稲敷郡阿見町吉原3586 津村研究所

\( ㉑ 発 明 者 西 村 浩 昭 茨城県稲敷郡阿見町吉原3586 津村研究所

㉒ 出 願 人 株式会社津村順天堂 東京都中央区日本橋3丁目4番10号

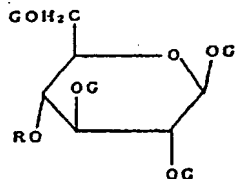
## 明 細 書

### 1. 発 明 の 名 称

アルドースリグクターゼ阻害剤

### 2. 特 許 請 求 の 範 囲

一般式



[式中Gはガロイル基を示し、Rは水素原子またはガロイル基を示す。]

で表される化合物を有効成分とするアルドースリグクターゼ阻害剤。

### 3. 発 明 の 詳 細 な 説 明

[産業上の利用分野]

本発明はアルドースリグクターゼ阻害作用を有し、白内障、網膜症、神経障害、腎臓等の糖尿病における各種合併症の治療に有用なアルドースリグクターゼ阻害剤に関するものである。

### [従来の技術および問題点]

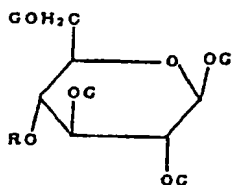
近年、白内障、網膜症、腎臓等の糖尿病における各種合併症の成因として、グルコースの代謝経路であるポリオール経路を介した細胞内ソルビトールの蓄積が注目されている。ポリオール経路は、グルコース、ガラクトース等のアルドースがソルビトール、ガラクトitol等のポリオールを介してフルクトース等のケトースに変換される代謝経路であり、免疫組織化学的手法により全身諸臓器に広く存在することが明らかになってきた。

この経路の第1段階であるアルドース-ポリオール間の変換を触媒する酵素をアルドースリグクターゼといい、この酵素がポリオール経路の律速酵素と考えられている。このアルドースリグクターゼを阻害し、ソルビトールの産生や蓄積を低下させることが、糖尿病患者における合併症の治療に有効であるという報告がなされている。

そこで、アルドースリグクターゼ阻害作用を有する薬剤の開発が望まれていた。

## 〔問題点を解決するための手段〕

本発明者等は、種々の生薬についてアルドースリグクターゼ阻害作用に関する研究を行った結果、芍薬 (*Paeonia lactiflora* PALL. またはその他の近縁植物の根) に強いアルドースリグクターゼ阻害作用があることを見出し、次いで、芍薬の活性成分について研究を進めた結果、一般式で表される化合物が極めて強いアルドースリグクターゼ阻害作用を有することを見出し本発明を完成させた。すなわち本発明は、一般式



〔式中 G はガロイル基を示し、R は水素原子またはガロイル基を示す。〕

で表される化合物 (以下、一般式の化合物と称する。) を有効成分とするアルドースリグクターゼ阻害剤である。

し、高速液体クロマトグラフィー (以下、HPLC) で目的成分を確認しながら分画することにより得ることができる。場合により水、アルコール類の適当な溶媒を用いて再結晶することにより精製してもよい。

一般式の化合物の製造の具体例を示すと次の如くである。

## 具体例 1

芍薬 1 kg を水・アセトン (1:4) 3 l で抽出し、抽出液よりアセトンを減圧下留去して、水溶液とし、酢酸エチル 500 ml で 3 回抽出した。酢酸エチル層を合併し、減圧下溶媒を留去して、酢酸エチルエキスを 20 g を得た。このエキスをセファデックス LH-20 (ファルマシア製) のカラムクロマトグラフィーに付し、水・エタノール混合溶媒系で濃度勾配をかけて溶出し、フラクション III およびフラクション IV を得た。フラクション III を熱水から再結晶して、保持時間 16.9 分 [HPLC 条件、カラム: TSK gel-L S-4 10 K (4 mm i.d. × 300 mm)、溶媒: 14% CH<sub>3</sub>CN-50 mM

一般式の化合物には、以下に示す化合物がある。

化合物名	R
1,2,3,6-テトラ-O- ガロイル-β-D- グルコース	水素
1,2,3,4,6-ペンタ-O- ガロイル-β-D- グルコース	ガロイル基

これらの化合物を得るには、例えば、次のような方法がある。

芍薬を、水、アルコール類または水とアルコール類、水とアセトンの混合溶媒で抽出し、該抽出液から溶媒を除去し残渣を、そのまま、あるいは水に溶解した後、酢酸エチルで抽出し、抽出液から酢酸エチルを留去した残渣を、水、水とアルコール類の混合溶媒、アルコール類、水とアセトンの混合溶媒から選ばれる少なくとも一つを溶出溶媒として、セファデックス LH-20 等のセファデックス、ダイヤイオン HP-20 等のポーラスポリマー等を担体に用いたカラムクロマトグラフィーに付

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> から始めて 20 分で 30% CH<sub>3</sub>CN-50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> に濃度勾配をかける、流速: 0.7 ml/min、検出波長: 280 nm、装置: 島津 LC-6A] を示す、無色粒状結晶の 1,2,3,6-テトラ-O-ガロイル-β-D-グルコースを得た。

## 具体例 2

具体例 1 で得たフラクション IV を、さらに上記と同じ展開溶媒を用いてセファデックス LH-20 のカラムクロマトグラフィーで精製し、凍結乾燥して、保持時間 19.6 分 [HPLC 条件は具体例 1 と同じ] を示す、白色粉末の 1,2,3,4,6-ペンタ-O-ガロイル-β-D-グルコースを得た。

具体例 1 および 2 で得た化合物の理化学的性質は、文献 [M. Nishizawa, T. Yamagishi, G. Nonaka, I. Nishioka, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 2963 (1982); idem., ibid., 961 (1983)] 記載の 1,2,3,6-テトラ-O-ガロイル-β-D-グルコースおよび 1,2,3,4,6-ペンタ-O-ガロイル-β-D-グルコースの性質とそれぞれ一致した。

次に一般式の化合物がアルドースリグクターゼ阻害作用を有することを実験例を挙げて説明する。

#### 実験例1

##### <アルドースリグクターゼ活性の測定>

6週齢のウイスター(Wistar)系雌性ラットをエーテル麻酔下に~~殺死させ~~、直ちに水晶体を摘出し、 $-20^{\circ}\text{C}$ にて保存した。

水晶体は $0.5\text{ mM}$ フェニルメチルスルホニルフロリドを含む $135\text{ mM}$ ナトリウム・カリウム・リン酸緩衝液( $\text{pH}7.0$ )にてホモジナイズして、 $30,000\text{ rpm}$ で30分間遠心した。その上清をアルドースリグクターゼ活性測定の検体とした。また、以上の操作はすべて $4^{\circ}\text{C}$ で行い、検体は $0^{\circ}\text{C}$ で保存した。

アルドースリグクターゼ活性の測定はデュフラン(Dufrane)らの方法[Biochemical Medicine, 32, 99-105(1984)参照]により行つた。すなわち、 $100\text{ mM}$ 硫酸リチウム、 $0.03\text{ mM}$  NADPH(還元型 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)、および基質として

$0.1\text{ mM}$  DL-グリセルアルデヒドまたは $20\text{ mM}$  グルコースを含むように調製した $135\text{ mM}$ ナトリウム・カリウム・リン酸緩衝液( $\text{pH}7.0$ ) $800\text{ }\mu\text{l}$ に、上記の検体 $100\text{ }\mu\text{l}$ および上記具体例1および2で得た化合物をそれぞれエタノールに $1\times 10^{-3}\text{ mg/ml}$ の終濃度となるように溶解させた薬物溶解液 $100\text{ }\mu\text{l}$ をそれぞれ加え、 $30^{\circ}\text{C}$ にて30分間反応させた。次に、 $0.5\text{ N}$ 塩酸 $0.3\text{ ml}$ を加えて反応を停止させ、 $10\text{ mM}$ イミダゾールを含む $6\text{ N}$ 水酸化ナトリウム $1\text{ ml}$ を添加することにより、前記の反応によつて生じたNADP(酸化型 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)を蛍光物質に変換して、60分後にその蛍光強度を測定した。蛍光強度は、室温で分光光度計RF-510(株式会社島津製作所製)を用いて励起波長 $360\text{ nm}$ 、蛍光波長 $460\text{ nm}$ の条件で測定した。また、薬物溶解液を加えるかわりにエタノールを加える以外は上記と同様にして反応させて測定した蛍光強度をコントロール値とした。

アルドースリグクターゼはNADPHを補酵素として、DL-グリセルアルデヒドあるいはグルコースをポリオールに変換する酵素であり、この反応に伴つてNADPHはNADPに変化する。従つてNADPが少なければ、アルドースリグクターゼが阻害されていることになる。

その結果を、阻害度(%)および50%阻害濃度( $\text{IC}_{50}$ )として第1表に示す。

第 1 表

ラットレンズのアルドースリグクターゼ  
に対する阻害作用

被験薬剤	阻害度(%) $10^{-3}\text{ mg/ml}$	$\text{IC}_{50}(\text{M})$
具体例1で得た 化合物	99.2	$6.3\times 10^{-7}$
具体例2で得た 化合物	61.0	$5.2\times 10^{-6}$

以上の結果から、一般式の化合物はアルドースリグクターゼの活性を著しく阻害することが認められ、糖尿病の合併症の予防または治療に有効であることが期待される。

次に一般式の化合物の経口投与での急性毒性試験をddY系マウスおよびウイスター(Wistar)系ラットを用いて行つたところ、いずれの化合物も $1\text{ g/kg}$ の経口投与で死亡例はなかった。

このように、一般式の化合物は極めて毒性が低く、安全性の高いものである。

本発明における実験データおよび急性毒性試験の結果から考えて、一般式の化合物の有効投与量は患者の年齢、体重、疾患の程度によつても異なるが、通常成人で一般式の化合物重量として1日量 $120\sim 600\text{ mg}$ を症状に合わせて1日3回程度に分けての服用が適当と認められる。

次に用例を示して具体的に説明するが、本発明はこれにより何ら制限されるものではない。

用例 1

具体例 1 で得た化合物 100 g を無水ケイ酸 20 g と混合し、これにトウモロコシデンプン 75 g を加え、さらに混合した。この混合物に 10% ハイドロキシプロピルセルロース・エタノール溶液を 100 ml 加え、常法通りねっ和し、押し出し、乾燥し、篩別することにより 20~50 メッシュの粒子の顆粒剤を得た。

この顆粒剤は、症状に合わせて 1 回量 80~400 mg (具体例 1 で得た化合物の重量として 40~200 mg に相当) として 1 日 3 回服用する。

用例 2

具体例 2 で得た化合物 40 g を無水ケイ酸 20 g と混合し、これに微結晶セルロース 10 g、ステアリン酸マグネシウム、乳糖 50 g を加え混合し、この混合物を単発式打錠機にて打錠して径 7 mm、重量 120 mg の錠剤を製造した。

本錠剤 1 錠は、具体例 2 で得た化合物 40 mg を含有する。本錠剤は、1 回 1~5 錠、1 日 3 回服用する。

用例 3

具体例 1 で得た化合物 40 mg を乳糖 100 mg と混合し、No. 0 のゼラチンカプセルに充填してカプセル剤を得た。

本カプセル剤は、症状にあわせて 1 回 1~5 カプセルを 1 日 3 回服用する。

特許出願人 株式会社 津村順天堂

代 表 者 津 村

